

Rec'd PCT/PTO 28 JUN 2004

JP03/06321

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

21.05.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日  
Date of Application:

2002年 5月21日

REC'D 11 JUL 2003

出願番号  
Application Number:

特願2002-146823

[ST.10/C]:

[JP 2-002-146823]

出願人  
Applicant(s):

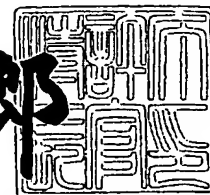
アークレイ株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月26日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3050264

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 R6570

【提出日】 平成14年 5月21日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ  
株式会社内

【氏名】 和泉澤 裕司

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ  
株式会社内

【氏名】 鎌田 達夫

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000040

【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

【代表者】 池内 寛幸

【電話番号】 06-6135-6051

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 139757

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0107559

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗酸菌の溶菌方法およびそれを用いた遺伝子増幅若しくは検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 抗酸菌から遺伝子を抽出するための溶菌方法であって、非イオン界面活性剤を含む液体中において、前記抗酸菌を、前記液体の沸点未満の温度で加熱する方法。

【請求項 2】 前記加熱温度が、70℃以上100℃未満である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記加熱時間が、1～30分である請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】 前記加熱条件が、96℃で10分間の条件である請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】 前記液体の pH が、pH 7.0～12.0 の範囲である請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】 前記液体中の前記非イオン界面活性剤の濃度が、0.01～10重量%である請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 非イオン界面活性剤が、d-ソルビトール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステルおよびポリオキシエチレングリコール p-tert-オクチルフェニルエーテルからなる群から選択される少なくとも一つである請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 さらに、前記液体が、金属キレート剤を含む請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】 前記液体中の前記金属キレート剤の濃度が、0.1～100mMである請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】 前記金属キレート剤が、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、エチレングリコールビス (β-アミノエチルエーテル) -N, N, N', N'-四酢酸 (EGTA)、ジアミノシクロヘキサン四酢酸、o-フェナンスロリンおよびサリチル酸からなる群から選択された少なくとも一つである請求項 8

または9記載の方法。

【請求項11】 溶菌対象となる抗酸菌が、鳥型結核菌 (M. avium)、エム・イントラセルラレエ (M. intracellulareae)、エム・ゴルドネエ (M. gordonae)、ヒト型結核菌 (M. tuberculosis)、エム・カンサシイ (M. kansasii)、エム・フォルツイツム (M. fortuitum)、エム・ケロネエ (M. chelonae)、ウシ型結核菌 (M. bovis)、エム・スクロフラセウム (M. scrofulaceum)、パラ結核菌 (M. paratuberculosis)、チモチ菌 (M. phlei)、エム・マリヌム (M. marinum)、エム・シミエー (M. simiae)、エム・スクロフラセウム (M. scrofulaceum)、エム・スズルガイ (M. szulgai)、らい菌 (M. leprae)、エム・キセノピ (M. xenopi)、エム・ウルセランス (M. ulcerans)、鼠らい菌 (M. lepraemurium)、エム・フラベセンス (M. flavescens)、エム・テレエ (M. terrae)、エム・ノンクロモジェニクム (M. nonchromogenicum)、エム・マルメンス (M. malmoense)、エム・アシアティクム (M. asiaticum)、エム・ヴァケエ (M. vaccae)、エム・ガストリ (M. gastri)、エム・トリビアル (M. triviale)、エム・ヘモフィラム (M. haemophilum)、エム・アフリカヌム (M. africanum)、エム・サーモレジスタブル (M. thermoresistabile) およびスメグマ菌 (M. smegmatis) からなる群から選択される少なくとも一つである請求項1から10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】 抗酸菌を含む生体試料が、痰、髄液、糞、唾液、血液、組織および尿からなる群から選択される少なくとも一つである請求項1から11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】 抗酸菌の遺伝子を特異的に増幅若しくは検出する方法であって、請求項1から12のいずれかの方法により抗酸菌を溶菌して遺伝子を抽出し、これを試料として遺伝子を特異的に増幅若しくは検出する方法。

【発明の詳細な説明】

## 【 0 0 0 1 】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、抗酸菌の溶菌方法およびそれを用いた遺伝子増幅若しくは検出方法に関する。

## 【 0 0 0 2 】

## 【従来の技術】

結核は、今なお、世界的に重要な細菌性疾患であり、その治療方法のみならず診断方法は極めて重要である。結核の最終的確認は、培養法により行われるが、結核菌の増殖速度は極めて遅いため、培養法の前段階で実施される予備的診断方法の確立が望まれている。このような予備的診断方法として、注目されているのは、ポリメラーゼ チェーン リアクション（PCR法）を適用した方法である。この方法は、結核菌の遺伝子に特異的なプライマーを用い、結核菌の遺伝子を増幅して検出することにより、結核菌の有無を判定する方法である。

## 【 0 0 0 3 】

前記PCR法を適用した予備的診断方法では、その前処理として結核菌を溶菌して遺伝子を抽出する必要がある。従来の溶菌方法としては、例えば、有機溶媒等を用いた化学的方法、超音波や凍結・融解を繰り返す物理的方法等がある。しかし、結核菌は、その細胞壁の脂質含量が高く、従来の溶菌法では、遺伝子の抽出を十分に行うことができなかった。また、十分な抽出を行うためには、処理条件を過酷なものにする必要があり、それに伴い、特殊な装置や試薬を使用する必要があり、これに加え、処理時間の長期化や操作の煩雑化等の問題があった。このような溶菌の問題は、結核菌を含む抗酸菌全体の問題でもある。

## 【 0 0 0 4 】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、特殊な装置や試薬を用いることなく、簡単かつ短時間に抗酸菌を溶菌できる方法の提供を、その目的とする。

## 【 0 0 0 5 】

## 【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために、本発明の溶菌方法は、抗酸菌から遺伝子を抽出するための溶菌方法であって、非イオン界面活性剤を含む液体中において、前記抗酸菌を、前記液体の沸点未満の温度で加熱するという方法である。

## 【0006】

この方法によれば、非イオン界面活性剤溶液中で、抗酸菌を、例えば、96℃で10分間加熱するだけで、十分に遺伝子を抽出することができ、その後の遺伝子増幅若しくは検出方法を簡単に実施できる。また、加熱温度が、前記液体の沸点未満であるため、突沸して試料が飛び散ることが無く、また温度コントロールが容易になって、特別の加熱器を必要としない等の利点がある。

## 【0007】

## 【発明の実施の形態】

以下に、本発明をさらに詳しく説明する。

## 【0008】

本発明の方法において、前記加熱温度は、70℃以上100℃未満が好ましく、より好ましくは80℃以上100℃未満であり、最適には96℃である。また、加熱時間は、例えば、1～30分であり、好ましくは10分間である。前記液体のpHは、例えば、pH7.0～12.0の範囲であり、好ましくはpH8.0である。前記液体中の前記非イオン界面活性剤の濃度は、例えば、0.01～10重量%であり、好ましくは0.5～2.0重量%であり、より好ましくは1.0重量%である。

## 【0009】

前記非イオン界面活性剤としては、例えば、Span 20, Span 40, Span 60, Span 65, Span 80, Span 85等（以上、ナカライテスク社製等）のd-ソルビトールの脂肪酸エステル、Tween 20, Tween 21, Tween 40, Tween 60, Tween 65, Tween 80, Tween 81, Tween 85等（以上、ナカライテスク社製等）のポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル、Triton X-100等（以上、ナカライテスク社製等）のポリオキシエチレングリコールp-tert-オクチルフェニルエーテル等がある。これらは、単独で使用してもよいし、2種類以

上で併用してもよい。このなかで、TritonX-100、Tween20、Tween21が好ましく、より好ましいのはTritonX-100である。

【0010】

本発明の方法において、さらに、前記液体が、金属キレート剤を含むことが好ましい。試料中には、DNase等の遺伝子分解酵素が含まれており、金属キレート剤は、これによる遺伝子の分解を防止する作用等を発揮する。前記液体中の前記金属キレート剤の濃度は、例えば、0.1~100mMであり、好ましくは1.0mMである。前記金属キレート剤としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチレングリコールビス( $\beta$ -アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)、ジアミノシクロヘキサン四酢酸、o-フェナンスロリン、サリチル酸等がある。これらは、単独で使用してもよいし、2種類以上で併用してもよい。このなかで、好ましいのは、EDTA、EGTAであり、より好ましいのは、EDTAである。

【0011】

本発明の溶菌方法の対象となる抗酸菌としては、例えば、鳥型結核菌(M. avium)、エム・イントラセルラレエ(M. intracellulareae)、エム・ゴルドネエ(M. gordonae)、ヒト型結核菌(M. tuberculosis)、エム・カンサシイ(M. kansasii)、エム・フォルツイツム(M. fortuitum)、エム・ケロネエ(M. chelonae)、ウシ型結核菌(M. bovis)、エム・スクロフラセウム(M. scrofulaceum)、パラ結核菌(M. paratuberculosis)、チモテ菌(M. phlei)、エム・マリヌム(M. marinum)、エム・シミエー(M. simiae)、エム・スクロフラセウム(M. scrofulaceum)、エム・スズルガイ(M. szulgai)、らい菌(M. leprae)、エム・キセノピ(M. xenopi)、エム・ウルセランス(M. ulcerans)、鼠らい菌(M. lepraemurium)、エム・フラベセンス(M. flavescens)、エム・テレエ(M. terrae)、エム・ノンクロモジェニクム(M. nonchromogenicum)、エム・マルメンス(M. malmoeense)、エム・アシアティクム(M. asi

aticum)、エム・ヴァケエ (M. vaccae)、エム・ガストリ (M. gastri)、エム・トリピアル (M. triviale)、エム・ヘモフィラム (M. haemophilum)、エム・アフリカヌム (M. africanum)、エム・サーモレジスタブル (M. thermoresistable) およびスメグマ菌 (M. smegmatis) 等がある。

【0012】

本発明の方法において、抗酸菌を含む生体試料としては、例えば、痰、髄液、糞、唾液、血液、組織、尿等がある。

【0013】

つぎに、本発明の方法は、例えば、以下のようにして実施できる。すなわち、まず、前記所定pHの緩衝液に、必要に応じてEDTA等の金属キレート剤を添加し、さらに非イオン界面活性剤を添加して溶菌試薬液を調製する。前記緩衝液としては、Tris-HClバッファー、HEPESバッファー、MOPSバッファー、HEPPSバッファー、TAPSバッファー、リン酸バッファー等がある。この溶菌試薬液は、オートクレイブにより高圧蒸気滅菌することが好ましい。他方、試料液を調製する。例えば、喀痰検体を、後述のN-アセチル-L-システイン-NaOH法 (NALC-NaOH法) 等により、均質化および雑菌処理する。前記処理をした検体を遠心分離して上清を除去し、残った沈殿物に前記溶菌試薬を添加する。そして、ヒートブロック等を用い、前記所定の温度で加熱することにより、溶菌処理を行う。なお、加熱方法としては、前記ヒートブロックの他に、例えば、ウォーターバス、マイクロウェーブオーブン、エアバス等がある。

【0014】

このようにして溶菌した検体は、そのまま、若しくは前処理を施して遺伝子増幅若しくは検出処理を行うことができる。前記遺伝子増幅若しくは検出方法としては、例えば、PCR法、RT-PCR等のPCRの変法等がある。また、分析対象となる遺伝子としては、DNA、RNAがある。

【0015】

【実施例】

つぎに、本発明の実施例について比較例と併せて説明する。

【0016】

(実施例1、比較例1)

臨床分離結核菌株を、商品名マイコプロス（極東製薬社製）にてMcEarland#1の濁度になるまで37℃で培養し、この菌株を滅菌蒸留水で希釈して10倍希釈系列（ $10^0$ 倍希釈～ $10^{10}$ 倍希釈）を作成し、これらを試料とした。他方、TE緩衝液（10mMのEDTA、25mMのTris-HCl：pH8.0）に3重量%の濃度で商品名TritonX-100（ナカライ社製）を溶解して溶菌試薬液を調製し、これをオートクレイブで高圧蒸気滅菌したものを使用した。

【0017】

前記希釈試料のそれぞれ（100 $\mu$ L）に、前記溶菌試薬50 $\mu$ Lを添加し、ヒートブロックにて96℃で10分間加熱し、溶菌処理を行った。また、比較例1として、商品名アンプリコア検体前処理キット（日本ロシュ社製）を用い、前記試料を溶菌した。

【0018】

このようにして得られた実施例1および比較例1の各溶菌試料液37.5 $\mu$ Lに、商品名アンプリコア増幅検出キット（日本ロシュ社製）のpre mixture 50 $\mu$ L及び12mM酢酸マグネシウム 12.5 $\mu$ Lを添加し、前記キットの操作説明書どおりコバスアンプリコアにてPCR法による増幅・検出を行った。

【0019】

前記増幅・検出の結果、実施例1および比較例1共に、 $10^7$ 倍希釈までは陽性であり、それ以上の希釈倍率では陰性であった。この結果から、実施例1の溶菌処理は、従来の方法（比較例1）と同等の感度（溶菌効率）といえる。さらに、実施例1の溶菌方法は、従来の方法（比較例1）に比べ、処理時間が半分に短縮された。

【0020】

(実施例2、比較例2)

臨床分離結核菌株を、商品名マイコプロス（極東製薬）にてMcEarland#1の濁度になるまで37℃で培養した。この培養菌株を、商品名スプタザイム（極東製薬

社製)で均質化した非結核性喀痰で希釈して10倍希釈系列( $10^0$ 倍希釈~ $10^{10}$ 倍希釈)を作成し、これらを試料とした。他方、TE緩衝液(10mMのEDTA、25mMのTris-HCl: pH8.0)に3重量%の濃度で商品名TritonX-100(ナカライ社製)を溶解して溶菌試薬液を調製し、これをオートクレイブで高圧蒸気滅菌したものを使用した。

## 【0021】

前記希釈試料のそれぞれ(100 $\mu$ L)に、前記溶菌試薬50 $\mu$ Lを添加し、ヒートブロックにて96℃で10分間加熱し、溶菌処理を行った。また、比較例1として、商品名アンプリコア検体前処理キット(日本ロシュ社製)を用い、前記試料を溶菌した。

## 【0022】

このようにして得られた実施例2および比較例2の各溶菌試料液37.5 $\mu$ Lに、商品名アンプリコア増幅検出キット(日本ロシュ社製)のpre mixture 50 $\mu$ L及び12mM酢酸マグネシウム 12.5 $\mu$ Lを添加し、前記キットの操作説明書どおりコバスアンプリコアにてPCR法による増幅・検出を行った。

## 【0023】

前記増幅・検出の結果、実施例2および比較例2共に、 $10^4$ 倍希釈までは陽性であり、それ以上の希釈倍率では陰性であった。この結果から、夾雑物の影響下であっても、実施例2の溶菌処理は、従来の方法(比較例2)と同等の感度(溶菌効率)であるといえる。さらに、実施例2の溶菌方法は、従来の方法(比較例2)に比べ、処理時間が半分に短縮された。

## 【0024】

## (実施例3、比較例3)

患者より得られた喀痰検体90例を、前記NALC-NaOH法(日本結核病学会編纂「新結核菌検査指針2000」)にて、均質化および雑菌処理を行った。前記処理後の喀痰検体100 $\mu$ Lを13,000gで10分間遠心し、上清除去後、沈殿物(ペレット)を回収した。他方、TE緩衝液(10mMのEDTA、25mMのTris-HCl: pH8.0)に1重量%の濃度で商品名TritonX-100(ナカライ社製)を溶解して溶菌試薬液を調製し、これをオートクレイブで高圧蒸気滅菌して使用した。すなわち、前記

ペレットに、前記溶菌試薬液50 $\mu$ Lを加えて懸濁させた。この懸濁液をヒートブロックにて96℃で10分間加熱し、溶菌処理を施した。他方、比較例3として、商品名アンプリコア検体前処理キット（日本ロシュ社製）を用い、前記試料（ペレット）を溶菌した。

## 【0025】

このようにして得られた実施例3および比較例3の各溶菌試料液12.5 $\mu$ Lに、商品名アンプリコア増幅検出キット（日本ロシュ社製）のpre mixture 50 $\mu$ L及び12mM酢酸マグネシウム 37.5 $\mu$ Lを添加し、前記キットの操作説明書どおりコバスアンプリコアにてPCR法による増幅・検出を行った。また、前記試料（ペレット）について、常法により、培養検査を行った。

## 【0026】

これらの結果、喀痰検体90例中、従来の方法（比較例3）で処理した場合、結核陽性が41例、陰性は49例であり、本発明の方法（実施例3）で処理した場合、結核陽性が41例、陰性は49例であり、両方法の結果は一致した。また、培養検査での結果は、42例が結核陽性、48例が陰性であり、実施例3および比較例3との一致率は略100%（97.8%）であった。これらの結果を下記の表1に示す。このように、本発明の方法の溶菌効果は、従来の方法と同程度であり、実際の臨床検査においても有用であるといえる。また、実施例3の方法は、比較例3の方法より、溶菌処理時間が30分間も短縮された。

## 【0027】

【表1】

		比較例3		
		陽性	陰性	計
実施例3	陽性	40	1	41
	陰性	1	48	49
	計	41	49	90
一致率		97.8%		

## 【0028】

【発明の効果】

以上のように、本発明の溶菌方法は、特殊な装置や試薬を用いることなく、簡単かつ短時間に抗酸菌を確実に溶菌できる方法である。したがって、本発明の方法を、遺伝子の増幅・検出法による抗酸菌検査の試料の前処理に適用することにより、検査の効率化を簡単に実現できる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 特殊な装置や試薬を用いることなく、簡単かつ短時間に抗酸菌を確実に溶菌できる方法を提供する。

【解決手段】 非イオン界面活性剤を含む液体中において、前記抗酸菌を、前記液体の沸点未満の温度で加熱すると、溶菌し、遺伝子が抽出できる。前記過熱条件は、96℃で10分間が好ましい。また、非イオン界面活性剤としては、d-ソルビトール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステルおよびポリオキシエチレングリコールp-tert-オクチルフェニルエーテル等が使用できる。前記液体は、pH8が好ましく、EDTAを含むことも好ましい。

【選択図】 なし

特2002-146823

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000141897]

1. 変更年月日	2000年 6月12日
[変更理由]	名称変更
住 所	京都府京都市南区東九条西明田町57番地
氏 名	アークレイ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**